食用菌類之育種技術

王西華　林美雪　許瑞祥　國立臺灣大學農化系

摘要：菇類育種工作可分爲兩個方向進行：一、了解現有菌種的特徵；二、根據特徵及需求，用適當的方法進行育種。所謂的特徵包括菇體的外形、大小、顏色、保鮮期（shelf-life）、控制出菇的溫度效應及受光效應等傳統性質。此外由於生化技術及分子遺傳技術的引入，目前更以同功酵素電泳圖譜（enzyme electrophoresis profile），及 DNA 各型長度的限制酶切片（Restriction Fragment Length Polymorphisms—RFLPs）作爲研究菌種類緣間關係的指紋（finger-print）以及育種時同性核體（homokaryon）的篩選及鑑定。

關於育種的方法包括：自然篩選、誘導突變、及傳統育種研究的交配反應（mating reaction）、菌絲融合（anastomosis），另外尙有近來發展的菌絲體細胞原生質融合（protoplast fusion），和分子遺傳技術的基因重組（gene cloning）之運用。而育種的操作中同性核體（homokaryon）的取得，除了由傳統的單孢分離培養，尙可利用細胞核選擇（nuclear selection）的理論，由貧脊培養基中所培養的老化菌絲碎段取得同性核體，又近來由菌絲體細胞的再生原生質體（protoplasts）亦可取得同性核體。

本文所述的各例包括來自 1986 年在美國賓州、及1987年在德國 Braunschweig 所舉辦的國際食用眞菌技術研究會之內容。

前　　言

菇類育種工作可分爲兩個方面進行：一、了解現有菌種的特徵，例如農藝特徵及市場需求；二根據特徵及需求，用適當的方法進行育種。所謂的農藝特徵包括菇體的外形、大小、顏色、保鮮期（shelf-life），控制出菇的溫度效應及受光效應等（Anon, Somycel & Darlintong）。這些特徵即爲育種研究時篩選目標菌株所依據的外表型（Phenotype）。此外由於生化技術及分子遺傳技術的引入，目前更以同功酵素電泳圖譜（enzyme electrophoresis profile）（Royse & May, 1982）及 DNA 各型長度限制酶切片（Restriction Fragment Length Polymorphism—RFLPs, Castle et al., 1987），作爲研究菌種類緣關係的指紋（finger print），以及育種時同性核體（homo-karyon）的篩選及鑑定。

關於育種的方法：自然篩選及誘導突變（induced mutation）是最基本且重要的方法，只要配合一套快速而正確的檢視法，便可有效地取得目標菌株。其他如傳統育種研究的交配反應（mating type）(Wang, Hsu 1987；許、王，1986，1987；張東柱，臺

大植病所碩士論文，1981），菌絲融合（anastomosis）及近年來的原生質融合（protoplast fusion），分子遺傳技術的基因重組（gene cloning）等。然而這些技術的引用，必須在有條件的限制下進行（Esser, 1986），例如交配反應只適合於有完整的生活史及清楚的交配系的菌株，且還要考慮配子體（如菇類的同性核體）的取得、親合性與否。至於菌絲融合，可藉原生質體融合來强制進行，但如來自兩不親合的菌絲仍不能融合成功。基因重組雖可跨越「種」的限制更跨越基因特性的限制，但需要在有適當的基因標誌及載體的先決條件下才能進行，尤其是載體，對於眞菌遺傳技術，目前最迫切需求的載體，應該是一個既可在眞菌細胞又可在細菌細胞內進行複製（replication）及表現基因功能的雙向載體（Shuttle vectors, Esser et al, 1983）。有關眞菌育種技術的限制條件之比較，玆整理列於表一。

表一、眞菌遺傳育種技術的三種操作方向之比較

	先決條件	對象	材料	作用機制	不親合性	範圍	基因重組率	特色
有性世代 sexual cycle	完整的生活史及清楚的交配系	完全眞菌 (perfect fungi)	配子 (gametes)	減數分裂 (meiosis)	存在	細胞核基因 (nuclear genes)	$>10^{-2}$	種內交配 (intra-species cross)
擬性世代 parasexual cycle	異核體 (heterokaryons) 的形成	不完全眞菌 imperfect fungi)	體細胞 ie. 菌絲	有絲分裂 (mitosis)	存在	細胞核基因	$\leq 10^{-2}$	跨「種」之限制 (ie. intra species or interspecies)
基因重組 gene cloning	適當的基因標誌及載體 (vector)	不拘	外來 DNA (foreign DNA)	載體的轉形或轉導 (transformation transduction)	不存在	細胞核基因及核外基因 (extra-chromosome genes)	$10^{-3}\sim 10^{-5}$	跨越「種」更跨越「遺傳」的限制

生化及遺傳特性

1. 同功酵素（Isozyme）：

對於所有白腐菌（white-rot fungi）而言，分解木質成分及纖維質成分是獲取碳源及能量的主要方法。然而由木質素（lignin）消耗量及半纖維質（hemicellulose）消耗量看來，各種白腐菌，即使生長在相同的木質纖維基質上，其分解酵素之活性亦有明顯差異，例如培養在檸檬草時，各白腐菌作用的木質素消耗量及半纖維素消耗量：靈芝是18.19%，38.55%，洋菇是19.37%，7%，墨水菇是42.6%，32.35%(Rolz et al, 1986)。另外，Dill & Kraepelin, 1986 年研究靈芝（*Ganoderma applanatum*）腐生在硬質木（hard-wood）所表現的高度選擇性及擴張性的木質纖維分解力。由木質素殘量比較結果顯示對不同品種的硬質木，靈芝的木質分解力有差異，例如在*Eucryphia cordifolia* 樹的腐木中最大木質素殘量爲 22.4%、9.9%、8.2%不等。又 *Drimys winteri* 樹腐木中最大木質素殘量爲12.6%、7.6%、6.0%不等。而對同一品種硬質樹種，但來自不同採樹區的硬木，靈芝所表現的木質分解力，最大可差別 4 倍左右。由上述的試驗結

果可推想這些白腐菌的木質素分解酵素或半纖維分解酵素可能具多型性的同功酵素。

顯然地，多型性同功酵素可視爲許多腐木類眞菌的特徵。Laccase 同功酵素的電泳圖譜已被用以比較來自不同地區的蠔菇（*Pleurotus ostreatus*）分離株之特性（Prellinger & Molitoris, 1979）。由蠔菇的 6 個品系（races）的 Laccase 同功酵素型，可看出 6 個品系之間有極密切的類源關係（Blaich & Esser, 1975）。

近來已有許多學者利用酵素電泳類型作爲決定遺傳相關性及菌種品系之確定，而目前則尋求以同功酵素圖譜，作爲另一種新遺傳標誌，此法較之於形態標誌（morphological markers）有下列幾點優點（Royse et al., 1983）：一、它不受來自環境與基因型的交互作用（environment/genotype interaction）的影響。二、不論隱性或顯性對偶基因的表現皆可由酵素電泳圖譜看出。三、每一條蛋白質條紋與設定的基因型是一對一的關係，故可引爲菌種基因型之設定。Kulkarni 等人（1987）比較30株雙核體蠔菇（*Pleurotus ostreatus*）菌株的20種酵素之電泳圖譜，結果發現共有15種酵素具有多型性（polymorphism）的同功酵素，其中例如 Alcohol Dehydrogenase 有 8 個蛋白質條紋代表 8 型同功酵素， Glucose Oxidase 則有 4 型同功酵素。依據酵素的多型性，上述30株蠔菇分離株可區分爲28種不同的基因型類別（圖一）。此顯示這些分離株之間存在著很大的基因多樣性（genetic variety）。

2. 訊息一核醣核苷酸（m-RNA）：

關於墨水菇（*Coprinus cinereus*）形態發育機制的研究，已有許多學者提出了報告。Uno & Ishikawa（1982）認爲 C-AMP 可能是作爲子實體形態發育的一個起始訊號（trigger）。Mclaughlin（1982）就減數分裂前後時期担子座（basidium）的細胞微細構造變化說明在減數分裂後， 担子座膨大，內質網及高爾基體凹槽（Golgi Cistenae）顯得十分粗糙。至於遺傳研究已確證有些形態發育突變株會阻礙子實體菌柄（stipe）之生長（Takemura & Kamada, 1972）。

Yashar & Pukkila, 1985年，以 m-RNA階段來探求子實體形態發育的機制。由墨水菇的營養雙核體（vegetative dikaryon）及子實體（fruit bodies）分離出poly(A)-mRNA，用以製造其互補 DNA 探針（Complementary DNA Probes），作爲確立一個墨水菇基因庫的 DNA 互補序列（DNA complementary sequence），並嘗試證明此菌的形態發育與細胞內的核醣核苷酸有關，特別是 poly(A)-mRNA 的數量變動。DNA 雜交（DNA-DNA hybridization）結果顯示的確有某些 DNA 序列的轉錄（transcripts），在營養體細胞或在子實體細胞都一樣活躍，而有些 DNA 序列只在其中的一種組織細胞較活躍，因此推想在子實體形態發育及減數分裂程序進行中，轉錄的表現具有組織及模板的專一性（tissue and temporal specificity）。

3. DNA層次（DNA level）之研究：

由於洋菇是屬於二次雌雄同體（secondary homothollism），每一担孢子含有兩個不同性別的核， 萌發後成爲多核（multinuclear）菌絲，因此很難得到育種所需的單性核體及了解其遺傳特徵，Horgen et al. (1986) 及 Castle et al. (1987) 已發展出以DNA限制酶切段長度的多型性(DNA Restriction Fragment Length Polymorphisms-RFLPs)作爲洋菇的基因標誌，且作爲篩選野生型及商用菌株的指紋依據，而Anderson等人(1987)的研究已成功地以 RFLPs 配合原生質體的再生（protoplast regeneration）

，而分離出洋菇的同性核體（homokaryon）。由野生型單性核株與商用菌株的同性核體可交配出預定的洋菇種內雜交種（introspecies hybrids）。關於洋菇粒腺體基因群（Mitochon drial genone）之研究，由缺失約 20Kb 長的粒腺體 DNA 突變株與正常洋菇菌株相互交配的結果，已獲知一些有關洋菇細胞質內的遺傳訊息。此外已製成了一些可供洋菇商用菌株基因轉移操作所需的載體（vectors）。

Labarere（1987）已經成功地由一個同性核體的 *Agrocybe aegeria* 菌絲中的細胞核，分離純化出一段大於 50Kb 長的 DNA 片段，此 DNA 再以限制酶（restriction enzyme）Sau 3A 部分水解成更小片段後接入*E. coli* 載體pBR_{322}的限制位置 BamHI，此混合載體（hybrid plasmids）再轉殖（transform）進入 *E. coli* 菌體內，轉殖率（transformation efficience）相當於每 1μg 完整的pBR_{322}可轉殖 1.3×10^5 細胞，被成功地殖入混合載體的 *E. coli* 菌落約佔60%。

育　　種

1. 自然篩選（Natural Selection）：

據估計地球上存在的眞菌超過250,000種，而目前已分離保存的眞菌有 170,000多株，大概可歸納成7,000種（L. C. Wu, 1987），因此，自然界存在且尚未分離的眞菌群正提供了一個廣大的遺傳變異來源（genetic varieties of resource）。故由自然篩選獲得優良菌株，不啻爲菌種改良的一個好途徑。

Stoller & Stauffer 氏，1953年，篩選得到的洋菇自然變異株 *A. bisporus* 可產生雪白的子實體，因而取代了原來產生褐色或奶油色子實體的舊菌株，成爲一株具有經濟價値的商用菌株。早期的 *V. volvacea*，幾乎所有的菌株都產生黑褐色的菌蓋，而 Tu & Cheng 氏，1978年篩選得到一株可產生白色菌蓋的新分離株；當菌株培養在照光度 50 luxes，可獲得完全白色的菌蓋，惟培養在 200 luxes 以上的照光度時，菌蓋中央會出現褐斑。

2. 突變（Mutation）：

由於自然突變率十分低（最大爲10^{-6}），遂以人爲誘導突變來擴大基因型的變異性，期望能提高目標突變株（target mutants）的篩取率。然而突變株的篩選，須仰賴一套正確而快速的檢視法（accurate and rapid screening methods）才能在繁多的細胞中，挑取出目標突變株。

Elliolt（1979 b）以重組互補營養要求突變株（Complementary auxotroph）而獲得一縐邊菌褶（frilly-gill）的洋菇突變株。由於原有的菌株是堅直邊的菌褶（hard-gill），此種菌褶較不理想，菌膜（velum）的生成亦不適當，其中的擔孢子產生不多，而縐邊菌褶突變株，除了菌褶邊緣較不適當外，其餘各項包括菌膜等皆十分良好，營養要求株的取得可藉紫外光照射在菌體細胞或原生質體（protoplasts）的處理；此外直接由洋菇菌絲片段亦可自然篩得營養要求株（Wang，1972）。

Elliot 等人（1987）以紫外線照射，進行洋菇抗殺眞菌劑（Anti-fungicide），抗殺蟲劑及抗病原性之突變株篩選，這些基因突變標誌，可作爲檢視交配反應時雜交種的形成。

3. 傳統之育種研究：

Fristsche（荷）以交配反應（Mating reaction）研究*Lepista nuda* 菌種改良，單孢培殖（monospore culture）的菌絲體在外形及顏色皆有差異，可孕性菌絲體（fertile mycelium）表現出雙核及扣子體之型態。不同來源的野生型（wild type）相互交配的結果。在小規模的培養床上已可見到相當數量的出菇體（fruiting bodies）形成。

墨水菇*Coprinus comatus*，由於保鮮期(shelf life）很短且易自動分解(autolysis)造成菇體斑點出現。Fristsche 等人遂以單孢交配反應進行菌種改良，收集不同源的野生型的孢子進行單孢交配。已知各不同交配型產量及菇體性質（如外形、顏色、保鮮期）皆有明顯差異，但只有少數野生型是可孕性的，可見本法並未考慮交配型（mating type）的問題。

關於蠔菇的另一研究，Müller（德）已分離出一種具有較低的多醣體分解力的耐熱菌株（thermotolerant strains）。一般的溫度敏感菌株（temperature sensitive strains）不能在高於 20°C 的溫度下出菇乃是因爲它具有較高的自動分解能力，此作用會破壞了細胞壁成分生成及分解的平衡，而耐熱菌株可在 32～35°C 生菇乃是因爲它能產生一種金屬型蛋白質水解酵素（metal protease），此酵素會部分抑制（partially inactivate）細胞壁的分解酵素。

Labarere 以 4 種抗生素：chloramphenicol, neomycin, paromycin及 tobramycin 對洋菇（*Agrocybe aegerita*）進行耐抗生素同性核菌株（antibiotic-resistant homokaryotic strains）之篩選，在大約90%的殺傷率（killing rate）下，回收抗藥菌株，染色體分離分析（segregation analysis）顯示大多數的抗藥菌是由一個基因突變所造成。由優勢試驗（Dominance tests）得知這些突變多爲隱性的（recessive）。

Elliot（英）以紫外光突變進行洋菇（*Agaricus bisporus*）抗眞菌殺菌劑(fungicide resistant）變異株之篩選。各抗菌株培養在堆肥上以評估其出菇能力，並以高濃度之眞菌殺菌劑測試其抗性。有一羣變異株生長很差且爲不孕性，其抗藥性可能是隱性，另有一些變異株即爲可孕又保有原來的農藝特性。目前已得到抗菌株及營養要求株（auxotrophic strain）之間的雜交種，而重點則在於雙抗性異核株（doubly resistant heterokaryons）之取得。

4. 原生質體融合（protoplast fusion）：

關於菇類原生質體融合操作主要運用在强制菌絲體細胞融合，基因重組技術的質體轉形（plasmid transformation）以及使洋菇原生質體培養在限制培養基（minimum medium），可獲得同性核體（homokaryons）。總之，原生質體融合最大目的是藉强化細胞融合頻率而達到提高基因重組的產生，來自許多重要的菇類原生質體製備成功的例子，簡列於表二。

由於洋菇（*Agaricus bisporus*）的性別遺傳形式屬於二次雌雄同體（secondary homothallism），其擔孢子有兩個不同性別的細胞核的存在，經發芽形成的菌絲則爲多數核菌絲，因此很難得到同性核體（homokaryons）。關於洋菇菌株的單性核化作用的原理（Wang, 1974, 1987），以異核體洋菇菌絲碎段進行膜培養（membrane covered plates）時所觀察記錄的每一細胞的細胞核分布資料，來估算多數核比率（$NR = \frac{\text{majority nuclear number}}{\text{total nuclear number})}$，結果洋菇菌絲的細胞比率(NR)大約固定在0.6～

0.7，而將菌絲碎段菌絲細胞培養在貧瘠培養基中，培養較久的老菌絲，菌絲細胞核數有減少的現象，此一現象應該不是隨著培養時間的增加而引起細胞分裂(cell division)次數減少所致，也不可能是遽然的菌絲分膈 (septation) 所致，它應該是由於細胞核分解破壞 (degeneration of nuclei) 所造成的。基此假說，我們可以將洋菇菌絲碎段培養在貧瘠培養基中，以便分離同性核體。Leal-Lara &Eger (1978, 1982)，曾由蠔菇雙核體菌絲碎段培養在貧脊培養基中，而分離出單核化成分(monokaryotic components)。而 Wessels 等人 (1987) 的研究已可利用異性核系洋菇菌絲的再生原生質體 (regenerated protoplasts)，分離出同性核系菌絲，且其原生質體再生率高達25～30%。本研究若改用電融合 (electric fusion) 進行，可達到更高的再生率。

表二、食用眞菌原生質體之製備

Table 2. Preparation of protoplasts from edible fungi (Wu. 1987)

Species	Source* Material	Lytic Enzyme	Reference
Agaricus bisporus	M	β-D-glucanase, novozym 234, and snail enzyme	Yoo, Peberdy and You (1985)
Flammulina velutipes	F, M	*Trichoderma harzianum* enzymes	Kitamoto et al. (1984)
	M	Cellulase, zymolyase chitinese, and β-glucuronidase	Yamada et al. (1983)
Lentinus edodes	F, M	*T. harzianum* enzymes	Kitamoto et al. (1984)
	M, S	Cellulase-onuzuka and β-glucuronidase	Hong and Yeup (1985)
Morchella culenta	M	Chitinase and zymolyase	Moriguchi and Kotegawa (1985)
Pleurotus cornucopiae	M	Cellulase, zymolyase chitinase and β-glucuronidase	Wakabayashi et al. (1985)
Pleurotus florida	M	β-D-glucanase, novozym234, and snail enzyme	Yoo, Peberdy and You (1985)
Pleutorus ostreatus	M	Cellulase, zymolyase, chitinase, and β-glucuronidase	Yamada et al. (1983)
	M	Novozym 234	Go, Shin and Yoo (1985)
Pleurotus sajor-caju	M	Novozym 234	Go, Shin and Yoo (1985)
Volvariella bombycina	M	β-glucuronidase	Stille (1984)
Volvariella volvacea	M	*T. harzianum* enzymes β-D-glucuronidase, novozym 234, and snail enzyme	Santiago (1982) Yoo, Peberdy and You (1985)

*Source material included fruiting body (F), mycelium (M) and Spore (S).

Labarere & Noel, (1987)爲利於細胞融合及轉形的操作，已配合改良酵素濃度、細胞壁分解時間的控制、及培養基緩衝液的 pH 値，而達到有效地製備洋菇同性核體的原生質體。

關於稀孢子菌株 (sporeless strain) 的育種，由於蠔菇 (*Pleurotus spp.*) 的孢子常引起工作人員的過敏症及呼吸道疾病，且在貯藏期間孢子會萌發並侵蝕菌蓋的表面，故改良蠔菇品種需由稀孢子變異株 (sporeless mutants) 著手，Eger (1978) 及Leal-Lara, Eger (1982)以單核化(monokaryotization)技術使二親合性(compatible) 同性核株進行交配，可得到稀孢子變異株。Yoo 等人 (1984) 經由 *P. ostreatus* 及*P. florida* 的不同種的原生質體融合 (interspecific protoplast fusion)而得到稀孢子菌株。顯見來自不同種系的菌絲細胞融合的後代，常見的是不能產孢子或很少孢子，且孢子有很多是不能萌芽、發育的，而考慮靈芝栽培時，爲避免靈芝孢子所造成的連作害，也許可利用不同種的細胞融合育成無孢子或稀孢子的新品種。

4. 眞核載體 (eukaryotic vector) ：粒腺體 DNA 及粒腺體質體之應用

眞核 DNA 的基因工程技術操作上，一般是將眞核 DNA 插入原核載體 (prokaryotic vector) 再轉移至細菌細胞。但有許多眞核 DNA 可以成功地轉入原核細胞中，卻不能表現基因功能。又由於原核載體及病毒 DNA 在眞核細胞中不能進行複製 (replication) ，此乃複製源點 (origin of replication) 不能被眞核細胞所認同 (recognition) 。爲了解決上述的困難 ，目前已發展出一個新的研究方向：即「眞核基因選殖，應考慮使用眞核細胞爲宿主 (host) 且以眞核 DNA 爲載體」。於是一方面積極地在眞核細胞羣尋找眞核質體 (eukaryotic plasmids) ，目前已有許多眞核質體被確定 (參考表三) 。另一方面即使在眞核質體不存在時，也可以創立另一特殊眞核選殖系統 (a specific eukaryotic cloning system) ，即以粒腺體 DNA 或粒腺體質體製備雙向載體 (shuttle vectors) 。

表三、眞核質體 (Eukaryotic Plasmids)

Table 3. Eukaryotic Plasmids (Esser, 1986)

Species	*Strain*	*Size of plDNA Monomer (Kb)*	*Molecular Structure*	*Reference*
		FUNGI		
Mitochondria Associated				
Independent of mt "chromosome"				
Claviceps purpurea	Wild strain K1	5.6/6.8	Linear	Tudzyski et al.. 1983
Neurospora crassa	"Mauriceville lc	3.6	ccc	Collins et al.. 1981
Neurospora intermedia	"Labelle"	4.1	ccc	Stahl et al.. 1982
	"Fiji"	5.2	ccc	Stohl et al.. 1982
Homologue to parts of mt "chromosome"				
Aspergillus amstelodami	"Ragged"	1.2	?(Amplified)	Lazarus et al.. 1980
Neurospora crassa	"Stopper"	Variable	ccc. partially amplified	Bertrand et al.. 1980
	"Toky"	Variable	ccc. partially amplified	Devries et al.. 1981

表三（續）

Species	Strain	Size of plDNA Monomer (Kb)	Moleculur Structure	Reference
Podospora anserina	"Senescent"	2.4	ccc	Stahl et al.. 1978
Podospora curvicolu	"Senescent"	10.9	(Amplified)	Bockelmann unpublished
Nucleus Associated				
Dicryostelium discoideum		13.5		Metz et al.. 1983
Saccharomyces cerevisiae	Most strains	6.4	ccc. chromatin-like	Guerineau. 1982
Unknown Association				
Ascobolus immersus		6.4	Linear	Francou. 1982
Cephalosporium acremonium		21.0	ccc	Minuth et al.. 1982
Fusarium oxysporum		46.7	ccc	Guardolia et al.. 1982
Gaumannomyces graminis var. *tritici*		7.5/8.7		Honeyman and Currier. 1983
Kluyveromyces lactis		8.9/13.4	Linear	Cunge et al.. 1981
Morchella conica		6.0/8.0	Linear	Meinhardt and Esser. (1984)
Pichia membranaefaciens		6.4		Painting, 1982
Rhizoctonia solani		2.8	Linear	Hashiba et al., 1983
Saccharomyces cerevisiae		9.4	ccc	Clark-Walker and Azad, 1980
Saccharomyces rouxu		6.3		Toh-e et al., 1983
Saccharomyces bailii		5.5/6.4		Toh-e et al., 1983
Saccharomyces bisporus		6.5		Toh-e et al., 1983
Schizosaccharomyces pombe		6.4/9.6	ccc	Dcl-Giudice et al., 1979; Fournier et al., 1982
Torulopsis glabrata		9.4	ccc	Clark-Walker and Azad, 1980
HIGHER PLANTS				
Mitochondria Associated				
Beta vulgaris	Various commercial lines	1.3-1.5	ccc	Powling. 1981
Sorghum bicolor	CMS	5.3/5.7	Linear	Pring et al., 1982
Vicia faba		1.6	ccc	Negruk et al., 1982
Zea mays	cytopl. (N) (fertile)	1.9	ccc	Kemble et al., 1980
		2.4	Linear	
	cytopl. (S) (male sterilc)	1.9	ccc	Pring et al., 1977
		2.4/5.2/6.2	Linear	
Zea mays	12 Latin American races	5.5/7.5	Linear	Weissinger et al., 1982

After Esser et al., 1983.

利用粒腺體 DNA 或粒腺體質體製成適合眞核細胞的選殖載體 (cloning vector)，此一新觀念，乃Esser *et al.*, (1983)，首先提出。粒腺體 DNA 的應用乃是基於：一、近代學說認爲粒腺體是眞核細胞內的細菌性體內共生者(bacterial endosymbionts)。二、就遺傳物質的組織而言，粒腺體與細菌有很近的相似性，如共價密封的環狀 DNA (covalently closed circular DNA) 及質體的存在。而此一新研究方向的最終目的在於製造一種既可在眞核細胞中，又可在細菌細胞中複製且表現基因的雙向載體，此種雙向載體係部分粒腺體 DNA 片段或粒腺體質體嵌入細菌質體 pBR_{322} 所形成的載體 (Esser, 1983)。

結　　論

菇類育種工作的方向，仍是注重符合市場需求、高產量的菌株及優良菌種特性的保存。因此傳統育種及檢定方法，仍然是重要的。目前已發展出同功酵素的電泳圖譜及 DNA 各型長度限制酶切片 (RFLPs)，可以進一步的輔證傳統育種及檢定方法的結果。而育種的操作中同性核體的取得，除了由單孢分離培養，尚可利用細胞核選擇的理論，由貧脊培養基所培養的老化菌絲碎段分離取得，又近來由菌絲體細胞的再生原生質體亦可分離出同性核體。關於育種的方法，近來已發展出菌絲體細胞原生質融合技術及分子遺傳技術的基因重組，惟眞菌基因重組技術，尚還在雙向載體 (shuttle vector) 的篩選中。

參考文獻

許瑞祥，王西華，1987，利用單一雙核菌之交配反應進行靈芝屬(*Ganoderma*)菌株類緣關係之研究，中國農業化學會誌25(1)：119-124。

許瑞祥，王西華，1986，利用API-ZYM 酵素分析系統進行靈芝菌株分類之研究，中國農業化學會誌24(2)：103-109。

張東柱，1981，臺灣大學植病研究所論文。

Anderson, J. B., D. M. Petsche and M. L. Smith. 1987. Restriction fragment polymorphisms in biological species of *Armillaria melles*. Mycologia 79(1) : 69—76.

Anon: Strain requirements and markets; Strain Characteristics in Somycel Darlington, Darlington Mushroom Labarotories Limited, Littlehamton, West Sussex, England.

Blaich, R. and K. Esser. 1975. Function of enzymes in wood destroying fungi. II. Multiple forms of laccase in white rot fungi. Arch. Microbiol., 103 : 271—277.

Castle, A. J., P. A. Horgen and J. B. Anderson. 1987. Restriction Fragment Length polymorphisms in the Mushroom *Agaricus brunnescens* and *Agaricus bitorquis*. Appl. Environ. Microb. 53(4) : 816—822.

Dill, I. & G., Kraepelin, 1986. Palo Podrido: Model for extensive delignification of wood by *Ganoderma applanatum*, Appl. Environ. Microb.

52(6) : 1305—1312.

Eger, G. 1978. New ways of breeding and strain production for practical mushroom cultivation. Mushroom Sci., 10(2) : 415—420.

Elliot, T. J. 1979a. A gene affecting gill-structure in *Agaricus bisporus*, the cultivated mushroom. Trans. Br. Mycol. Soc., 73 : 347—348.

Elliot, T. J. 1979b. Spontaneous auxotrophs in *Agaricus bisporus*. Euphytica J. Gen. Microbiol., 155 : 505—508.

Elliot, T. J., M. P. Challen and K. L. Wilson. 1987. Fungicide resistance in *Agaricus bisporus*. In Abstract of XIIth International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi.

Elliott, T. J. and F. A. Langton. 1981. Strain improvement in the cultivated mushroom. *Agaricus bisporus*. Euphytica, 30 : 175—182.

Esser, K. 1986. Genetics of strain improvement in filamentous fungi with respect to biotechnology., In Overproduction of Microbial Metabolites: Strain improvement and process control strategies. (ed. Zdenko Vanek & Zdenek Hostaled) p. 143—164. Butterworths. Boston-London.

Esser, K., U. Kuck, U. Stahl and P. Tudzynski, 1983. Cloning vectors of mitochondrial origin for eukaryotes: A new concept in genetic engineering. Current Genet., 7 : 239—243.

Fristche, G. & P. van Loon. 1987. Trials on breeding with *Lepista nuda*. In Abstract of XIIth International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi.

Fristche, G. & P. van Loon. 1987. Trials on breeding with *Coprinus comatus*.

Horgen, P. A., R. Arhtur, O. Davy, A. Moum, F. Herr, N. K. Straus and J. Anderson. 1986. The nucleotide sequence homologies of unique DNA's of some cultivated and wild mushrooms. Can. J. Microbiol. 30 ; 587—593.

Kulkarni, R. V..C. D. Kamerath and K. L. Allred. 1987. Genetic diversity between isolates of *Pleurotus ostreatus* as revealed by isozyme analysis, in cultivating edible fungi (ed, P. J. Wuest, D. J. Royse and R. B. Beelman), Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo, P. 171—181.

Leal-Lara H. and G. Eger-Hummel. 1982. A monokaryotization method and its use for genetic studies in wood-rotting Basidiomycetes. Theor. Appl. Genet., 61 : 63—68.

Labarere, J. and T. Noel. 1987 b. Isolation and regeneration of protoplasts from homokaryotic mycelia of *Agrocybe aegerita.*, Abstract XIIth International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi. 20—26 Sept., 1987.

Labarere, J. and T. Noel. 1987a Isolation of DNA from *Agrocybe aegerita*,

and construction of a genomic library in *E. coli*. In Abstract of XIIth International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi. 20—26 Sept. 1987.

Labarere, J. and T. Noel, and M. Imbernon. 1987. Selection and Genetic Analysis of Antibiotic Resistant Metant Strains in *Agrocybe aegerita*, In Abstract of XIIth International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi.

Müller, J. 1987. Enzymatic regulation of temperature dependent fruit body morphogenesis in *Pleurotus ostreatus*. In Abstract of XIIth International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi.

Mclaughlin, D. J. 1982. Ultrastructure and cytochemistry of basidial and basidiospore development. In Basidium and Basidiocarp Evolution, Cytology Function, and Development (ed. K. Wells & E. K. Wells) p. 37—47. N. Y., U. S. A.: Springer-Verlag.

Prellinger, H. and H. P. Molitoris. 1979. Genetic analysis in wood-decaying fungi. I. Genetic variation and evidence for allopatric speciation in *Pleurotus ostreatus* using phenoloxidase zymograms and morphological criteria. Physiol. Plant., 46 ; 265—277.

Raper, C. A.1978. Sexuality and breeding. In S. T. Chang and W. A. Hayes (Editors), The biology and Cultivation of Edible Mushrooms, Academic Press, New York, pp. 83—117.

Raper, C. A.1985. Strategies for mushroom breeding. In: D. Moore, L. A. Casselton, D. A. Wood and J. C. Frankland (Editors), Developmental Biology of Higher Fungi, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 541—560.

Raper, J. R. and C. A. Raper. 1972. Life cycle and prospects for interstrain breeding in *Agaricus bisporus*. Mushroom Sci., 8 : 1—9.

Royse, D. J., M. C. Spear and B. May. 1983. Cell line authentication and genetic relatedness of lines of the shiitake mushroom, *Lentinus edodes*. J. Gen. Appl. Micorobiol. 29 : 205—216.

Rolz, C., R. Leon, M. C. Arriola and S. Cabrera. 1986. Biodelignification of lemongrass and citronella bagasse by white-rot fungi. Appl. Environ. Microb. 52(4) : 607—611.

Stoller, B. B. and J. F. Stauffer. 1953. Studies on naturally occuring and ultraviolet radiation induced strains of the cultivated mushroom *Agaricus campestris* L. Mushroom Sci. 2 : 51—65.

Tu, C. C. and S. Cheng, 1978. A new white variety of *Volvariella volvacea* (Bull. Ex. Fr.) Sing. Mushroom Sic.10(1) : 185—190.

Takemura, T. and T. Kamada. 1972. Basidiocarp development in *Coprinus*

macrorhizus I. Induction of development variations, Botanical Magazine (Tokyo) 85 : 51—57.

Uno, I. & T. Ishikawa. 1982. Biochemical and genetic studies on the initial events of fruitbody formation. In Basidium and Basidiocarp Evolution, Cytology, Function, and Development (ed. K. Wells) N. Y. U. S. A. pp. 113—123.

Wang, H. H. 1972. The existence of auxotrophic nuclei in nontreated mycelial fragments of commercial cultivated mushroom, *Agaricus bisporus.* Mushroom Sci. 8 : 254—459.

Wang, H. H. and J. Y. H. Wu. 1974. Nuclear distribution in hyphal system of *Agaricus bisporus*. Mushroom Sci. 9(I) : 23—29.

Wang, H. H. and J. P. Hsu. 1987. Nuclear number of heterocaryotic fungal Cells: Simple theoretical estimation & Application. In Cultivation of Edible Fungi (ed. P. J. Wuest, D. J. Royse & R. B. Beelman) Elsevier pp. 163—169.

Wessels, J. G. H et al., 1987. An efficient protoplasting/regeneration system for *Agaricus*. In Abstract of XIIth Intrenational Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi.

Wu, L. C. 1985. Composting technology. In D. Moore, L. A. Casselton, D. A. Wood and J. C. Frankland (Editors), Developmental Biology of Higher Fungi, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 541—560.

Wu, L. C. 1987. Strategies for conservation of genetic resources, In cultivating Edible Fungi (ed. P. J. Waest, D. J. Royse and R. B. Beelman.) Elsevier. Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo. pp. 183-211.

Yashar, B. M. and P. J. Pukkica. 1985. Changes in Polyadenylated RNA Sequences Associated with Fruiting Body Morphogenessis in *Coprinus cinereuis*. Trans. Br. Mycol. Soc. 84(2) : 215—225.

Yoo, Y. B., M. O. Bynn, S. J. Go, C. H. You, Y. H. Park and J. F. Peberdy. 1984. Characteristics of fusion products between *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida* following interspecific protoplast fusion. Korean J. Mycol. 12 : 164—169.

Yoo, Y. B., J. F. Peberdy and Y. H. Park. 1985. Isolation of auxotrophic mutants from protoplasts of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida*, Korean J. Mycol., 13 : 75—78.

Breeding of Edible Fungi

H. H. Wang, M. S. Lin and R. S. Hseu

Dept. of Agricultural Chemistry, NTU

The technical aspects of breeding of edible fungi are discussed from two points of views; (1) the identification of characteristics to be considered and (2) the selection of the method adequate for target breeding. Shape, Size, color and shelf life of fruiting bodies of mushrooms and the effects of light and temperature on growth and fructification are conventional characteristics. The electrophoretic profiles of isozymes and the restriction fragment lengh polymorphism (RFLP) are new ones, a kind of finger prints, to show the relationship(s) of the cultures and sometimes to be useful to isolate and identify homocaryons. The methods for breeding include conventional ones, natural selection, induced mutation, anastomosis and those by mating types. Recently protoplast fusion and gene cloning are introduced for breeding as new technologies. In this communication, the examples discussed in the international symposium of edible fungi held in University Park, Pa., 1986, and Braunschweig, 1987 , are included in this communication.